Iranian Food Science and Technology
Research Journal
Homepage: https://ifstrj.um.ac.ir

Research Article
Vol. 19, No. 5, Dec.-Jan. 2023, p. 663-673

Increasing the Production of Carotenoids in *Chlorella sorokiniana* IG-W-96 by Changing the Concentration of Nutrients and Phytohormones

Z. Noruzi Motlagh[1], M.A. Mahdavi[2*], R. Gheshlaghi[3]

1, 2 and 3- Ph.D. Student and Associate Professors, Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: mahdavi@um.ac.ir)

Received: 2022.10.02 Revised: 2022.11.05 Accepted: 2022.11.27 Available Online: 2022.11.30	**How to cite this article:** Noruzi Motlagh, Z., Mahdavi, M.A., & Gheshlaghi, R. (2023). Increasing the production of carotenoids in *Chlorella sorokiniana* IG-W-96 by changing the concentration of nutrients and phytohormones. *Iranian Food Science and Technology Research Journal, 19*(5), 663-673. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/ifstrj.2022.79014.1209

Introduction

Carotenoids have many effects on human health. These compounds are produced by plants and microalgae. The extraction of carotenoids from microalgae such as *Chlorella* has received much attention, since microalgae grow all year round (regardless of the season) and at a much faster rate than plants in non-arable lands. The aim of this research was to optimize the concentrations of nutrients (nitrogen and phosphorous) in the growth medium of microalgae with the objective of maximizing carotenoids content. At the optimized nutrient conditions, the effect of phytohormones on production of carotenoids using *Chlorella sorokiniana* IG-W-96 was investigated.

Materials and Methods

Chlorella sorokiniana IG-W-96 was cultivated in BG11 growth medium with light intensity of 25000 lux and light: dark cycle of 16: 8 supplied with compressed air flow of 0.5 vvm containing 6% vol carbon dioxide. Under three concentrations of nitrate (0.04, 0.25, 1.5 $g\,L^{-1}$) and three concentrations of phophate (0.01, 0.04, 0.16 $g\,L^{-1}$) and carotenoid concentration was measured. Full factorial experimnetal design was performed and the resuts of the experiments were analyzed using Minitab (ver. 21.01.1). Finally, the best concentrations of nitrate and phosphate were chosen for pigments production, and at that concentration, naphthalene acetic acid (0, 2.5, 5, 7.5, 10 and 12 ppm) was added to the culture medium to check its effect on pigments production. By measuring the dry weight of C. *sorokiniana*, its growth rate was determined. After extracting the pigments with solvent, the concentration of the pigments was determined by measuring the amount of light absorption.

Results and Discussion

Dry weight

The results showed that the highest amount of dry weight was related to the treatment with nitrate amount of 0.25 $g\,L^{-1}$, and nitrate more and less than this amount caused a decrease in growth. This result was not dependent on the amount of phosphate and was true for all phosphate concentrations. Nitrate reduction from 1.5 to 0.25 $g\,L^{-1}$ increased the growth of microalgae up to 81.8%, so that the dry weight of 0.88 $g\,L^{-1}$ reached 1.6 $g\,L^{-1}$. However, reduction of nitrate

https://doi.org/10.22067/ifstrj.2022.79014.1209

from 0.25 to 0.04 $g\ L^{-1}$ decreased the dry weight by 65.6%. In order to reach the maximum growth rate, it is necessary to determine the appropriate concentration of each nutrient.

Carotenoids

Unlike the dry weight, not only the pigment production did not decrease with the excessive of nitrate concentration, but also the maximum amount of pigment production was related to the treatment with the maximum amount of nitrate concentration. Based on the results obtained, the concentration of carotenoids was higher in the concentration of 1.5 $g\ L^{-1}$ of nitrate and 0.04 $g\ L^{-1}$ of phosphate (6.7 $mg\ L^{-1}$).

When the nitrate concentration was very low (0.04 $g\ L^{-1}$), changing the phosphate concentration had no significant effect on the production rate of any of the pigments. Only when the nitrate concentration was high (1.5 $g\ L^{-1}$), change in phosphate concentration caused a change in pigments concentration. The increase of phosphate concentration from 0.01 to 0.04 $g\ L^{-1}$increased the carotenoids concentration to 1.65-fold. Of course, increasing phosphate concentration to 0.16 $g\ L^{-1}$did not affect the pigments concentration.

Based on the statistical analysis, the P-value<0.05 indicated that the effect of the factors and the model was significant. In this situation, in order to increase the production of carotenoids, naphthalene acetic acid was added to the phytohormone culture medium. At the optimal concentration of 2.5 ppm of naphthalene acetic acid, the concentration of carotenoids increased by 26.71% and reached 8.49 $mg\ L^{-1}$. However, phytohormone had no significant effect on dry weight.

Conclusion

Carotenoid production using microalgae could be maximized through optimization of nutrients concentrations (nitrate and phosphate) in the growth medium. Phytohormones could further increase the prodcution of carotenoids at optimum concnetrations.

Keywords: C. *sorokiniana*, Nitrate, Phosphate, Pigment

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
https://ifstrj.um.ac.ir

مقاله پژوهشی

جلد ۱۹، شماره ۵، آذر- دی ۱۴۰۲ ص. ۶۷۳-۶۶۳

افزایش تولید کاروتنوئیدهای ریزجلبک *کلرلا* با استفاده از تغییر غلظت مواد مغذی و فیتوهورمون

زهره نوروزی مطلق[۱]– محمود اخوان مهدوی[۲*]– رضا قشلاقی[۳]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۷/۱۰
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۰۶

چکیده

کاروتنوئیدها اثرات فراوانی بر روی سلامتی انسان دارند. این ترکیبات توسط گیاهان و ریزجلبک‌ها تولید می‌شوند. امروزه استخراج کاروتنوئیدها از ریزجلبک‌های خوراکی همچون *کلرلا* بسیار مورد توجه قرار گرفته است، زیرا ریزجلبک‌ها در تمام سال (بدون توجه به فصل) و با سرعتی بسیار بیش‌تر از گیاهان در زمین‌های غیر زراعی رشد می‌کنند. هدف از این پژوهش ارایه روشی برای افزایش تولید کاروتنوئیدهای ریزجلبک *کلرلا سروکینیانا* است. برای این منظور، اثر غلظت‌های متفاوت از دو ماده مغذی نیترات سدیم به‌عنوان منبع نیترات و دی پتاسیم هیدروژن فسفات به‌عنوان منبع فسفات بر روی میزان تولید کاروتنوئیدها به صورت آماری بررسی شد. برای بررسی اثر غلظت‌های مختلف نیترات و فسفات از طرح کاملا" تصادفی آزمایش فاکتوریل و نرم‌افزار Minitab استفاده شد که در آن سطوح غلظت در نظرگرفته شده برای نیترات برابر $g\ L^{-1}$ ۰/۰۴، ۰/۲۵ و ۱/۵ و برای فسفات برابر $g\ L^{-1}$ ۰/۰۱، ۰/۰۴ و ۰/۱۶ بود. نتایج نشان داد که در غلظت $1/5\ g\ L^{-1}$ از نیترات و $g\ L^{-1}$ ۰/۰۴ از فسفات غلظت کاروتنوئیدها بیشینه است ($mg\ L^{-1}$ ۰/۲۱ ± ۶/۷۵). در این شرایط، جهت افزایش تولید کاروتنوئیدها، به محیط کشت فیتوهورمون نفتالن استیک اسید اضافه شد. در غلظت بهینه ppm ۲/۵ از نفتالن استیک اسید غلظت کاروتنوئیدها ۲۶/۷۱ ٪ افزایش یافت و به مقدار $mg\ L^{-1}$ ۰/۱۵ ± ۸/۴۹ رسید.

واژه‌های کلیدی: رنگدانه، *سروکینیانا*، فسفات، نیترات

مقدمه

کاروتنوئیدها از جمله رنگدانه‌هایی هستند که توسط گیاهان و ریزجلبک‌ها تولید می‌شوند. کاروتنوئیدها شامل دو گروه اصلی کاروتن‌ها و زانتوفیل‌ها هستند (Sathasivam and Ki, 2018). کاروتنوئیدهایی مانند لوتئین و زآزانتین می‌توانند با جذب طول موج‌های خاصی از نور به محافظت از چشم‌ها کمک کنند و β-کاروتن می‌تواند به ویتامین A تبدیل شود. به‌طور کلی کاروتنوئیدها کارایی قوی در از بین بردن گونه های فعال اکسیژن را دارند و می‌توانند از سلول‌ها در برابر آسیب‌های ناشی از اشعه‌ی UV و آفتاب سوختگی محافظت کنند (Maswanna and Maneeruttanarungroj, 2022). آن‌ها همچنین سیستم ایمنی بدن را تقویت می‌کنند (Udayan *et al.*, 2022) و باعث جلوگیری از ابتلا به سرطان، دیابت و بیماری‌های قلبی می‌شوند (Nwoba *et al.*, 2020). اگرچه که گیاهان حاوی کاروتنوئیدها هستند اما جالب اینجاست که رنگدانه‌ها در ریزجلبک‌ها می‌توانند در غلظت‌های بالاتری نسبت به گیاهان تولید شوند. مثلا" میزان β-کاروتن ریزجلبک *Dunaliella* حدود ۱۰۰برابر بیش‌تر از هویج است (Nwoba *et al.*, 2020). علاوه بر این ریزجلبک‌ها نرخ رشد بسیار بالاتری نسبت به گیاهان دارند برای مثال *Chlorella* با ظرفیت بالای فتوسنتز، قادر

۱، ۲ و ۳– به‌ترتیب دانشجوی دکتری و دانشیاران گروه مهندسی شیمی، دانشکده مهندسی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
(*– نویسنده مسئول: (Email: mahdavi@um.ac.ir

https://doi.org/10.22067/ifstrj.2022.79014.1209

است زیست توده سلولی خود را در کم‌تر از یک روز دو برابر کرده و با سرعتی صد برابر بیش‌تر از گیاهان رشد کند (Shu *et al.*, 2012; Sirisuk *et al.*, 2018). ریزجلبک‌ها در کل سال (بدون توجه به فصل) و در زمین‌های غیر زراعی قابل کشت هستند (Maswanna and Maneeruttanarungroj, 2022). از طرفی در مدت زمان مشخص، برای تولید یک تن توده زیستی ریزجلبک نسبت به تولید یک تن گیاه مساحت کم‌تری لازم است (Simionato *et al.*, 2013). بعلاوه توانایی رشد ریزجلبک‌ها در آب‌های شور و شیرین و فاضلاب (Udayan *et al.*, 2022) باعث شده تا نه تنها در مصرف آب آشامیدنی صرفه‌جویی گردد بلکه تصفیه فاضلاب با رشد ریزجلبک امکان‌پذیر شود. تمام این عوامل باعث شده تا محبوبیت تولید رنگدانه‌ها از ریزجلبک‌ها افزایش یابد.

از دیگر مزایای استفاده از رنگدانه ریزجلبک‌ها این است که می‌توان شرایط محیط کشت ریزجلبک (نور، دما، میزان مواد مغذی) را طوری تغییر داد که میزان سنتز رنگدانه‌ها و به‌طور خاص کاروتنوئیدها افزایش یابد (Pal *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2012). نیترات و فسفات از جمله مواد مغذی محیط کشت ریزجلبک هستند که اثر مستقیم بر روی تولید رنگدانه‌ها دارند. پژوهشگران سعی کردند تا با تغییر میزان نیترات و یا فسفات، تولید رنگدانه‌ها را افزایش دهند. در پژوهشی که در سال ۲۰۲۱ انجام شد، با افزایش غلظت نیترات و فسفات به ترتیب تا ۱۷۶۶ µM و ۷۶/۲ µM میزان تولید کلروفیل، لوتئین، ویولازانتین و β-کاروتن تولید شده توسط *Tetraselmis* افزایش یافت (Montes-González *et al.*, 2021). به‌طور مشابه افزایش نیترات از صفر تا ۷۲ $mg\ L^{-1}$ نیز باعث افزایش کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئیدهای *Isochrysis galbana* شد (Zarrinmehr *et al.*, 2020). دو برابر شدن فسفات میزان تولید کلروفیل و کاروتنوئیدهای *Tetraselmis* را به‌ترتیب ۱/۴۴ و ۲/۶ برابر افزایش داد (Dammak *et al.*, 2017). در پژوهش دیگری افزایش نیترات از ۰ تا ۳۰ mM و فسفات از ۰ تا ۵ mM باعث افزایش شدید کلروفیل *Chlorella kessleri* شد (Shrestha *et al.*, 2020). در پژوهشی که در سال ۲۰۱۹ انجام شد، مشاهده شد که کاهش میزان نیترات و فسفات در محیط کشت *Tisochrysis lutea*، میزان تولید کلروفیل a، کلروفیل c و فوکوزانتین را به شدت کاهش می‌دهد (Huang *et al.*, 2019). به‌طور مشابه کاهش نیترات باعث شد تا میزان کلروفیل *Scenedesmus* از ۷/۷۱ به ۲/۶۹ $\mu g\ mL^{-1}$ و میزان کارتنوئیدها از ۱/۳ به ۰/۶۱ $\mu g\ mL^{-1}$ کاهش یابد (Pancha *et al.*, 2014). علاوه بر تغییر غلظت مواد مغذی، دیده شده است که فیتوهورمون‌ها نیز اثر مثبت بر سنتز رنگدانه‌ها می‌گذارند. در پژوهشی که بر روی *Chlamydomonas reinhardtii* انجام شد، مشاهده شد که غلظت‌های بسیار کم (کم‌تر از ۱ ppm) فیتوهورمون‌های ایندول استیک اسید، جیبرلیک اسید و کینتین باعث افزایش تولید رنگدانه‌ها شد (Park *et al.*, 2013). در پژوهش مشابهی سنتز کلروفیل در ریزجلبک *Scenedesmus* با افزودن ایندول استیک اسید ۲۰٪ افزایش یافت (Dao *et al.*, 2018). همچنین در حضور ایندول استیک اسید و ایندول بوتیریک اسید و کینتین تولید کلروفیل a، کلروفیل b و زانتوفیل‌ها توسط *Acutodesmus obliquus* افزایش یافت (Piotrowska-Niczyporuk *et al.*, 2018). در پژوهش دیگری، β-کاروتن ریزجلبک *Dunaliella salina* در حضور مایو اینوسیتول و آبسزیک اسید به‌ترتیب ۵۸٪ و ۷۹٪ افزایش یافت (Lv *et al.*, 2019).

هدف از انجام این پژوهش افزایش تولید کاروتنوئیدهای ریزجلبک با استفاده از تغییر مواد مغذی (نیترات و فسفات) و یا افزودن فیتوهورمون (نفتالن استیک اسید) بود. برای این منظور، ریزجلبک *Chlorella* (*کلرلا*) به علت دارا بودن انواع مختلفی از کاروتنوئیدها شامل آستازانتین، ویولازانتین، زآزانتین، لوتئین و β-کاروتن (Sathasivam and Ki, 2018)، انتخاب شد. *کلرلا* قادر به کاهش سطح کلسترول و کاهش فشار خون است (Paniagua-Michel, 2015) و امروزه به عنوان مکمل غذایی سالم در بسیاری از کشورها مانند چین، ژاپن، اروپا و ایالات متحده استفاده می‌شود (Paniagua-Michel, 2015). در این پژوهش، اثر هر دو روش تغییر مواد مغذی و افزودن فیتوهورمون بر روی رشد و تولید رنگدانه‌های ریزجلبک خوراکی *Chlorella sorokiniana* بررسی شد. تا به حال اثر هورمون و تغییر مواد مغذی به‌طور همزمان بر روی یک ریزجلبک بررسی نشده است. برای این منظور، ابتدا غلظت بهینه فسفات و نیترات جهت تولید حداکثر کلروفیل و کاروتنوئیدها تعیین شد و سپس در غلظت بهینه‌ی بدست آمده اثر غلظت‌های مختلف از فیتوهورمون نفتالن استیک اسید بر روی میزان تولید کلروفیل و کاروتنوئیدها بررسی شد.

مواد و روش‌ها

کشت ریزجلبک

ریزجلبک *Chlorella sorokiniana* IG-W-96 که از فاضلاب تصفیه خانه پرکندآباد مشهد خالص‌سازی شده است و با شماره‌ی دسترسی MF459965.1 در پایگاه NCBI ثبت شده است در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفت. برای کشت ریزجلبک *کلرلا* از محیط کشت BG11 استفاده شد. کشت در یک بطری ۱ لیتری (با حجم کاری ۷۵۰ میلی‌لیتر) با چگالی نوری (OD) اولیه ۰/۰۷۵ (در طول موج ۶۸۰ نانومتر)، انجام شد. بطری حاوی ریزجلبک درون شیکر انکوباتور با دمای ۱ ± ۲۵ سانتی‌گراد قرار داده شد. برای نوردهی کشت در داخل شیکر انکوباتور از LED سفید با شدت نور ۲۵۰۰۰ لوکس (تایوان، Lutron LX-1108) با چرخه روشنایی: تاریکی ۸:۱۶ استفاده شد.

جریان هوای فشرده به میزان ۰/۵ vvm حاوی ۶ ٪ حجمی دی‌اکسید کربن، پس از عبور از فیلتر ۰/۲۲ µm وارد بطری حاوی ریزجلبک شد. در انتهای فاز لگاریتمی وزن خشک ریزجلبک و میزان تولید رنگدانه آن اندازه‌گیری شد.

طراحی آزمایش‌ها

در تمام آزمایشات، همه مواد به جز $NaNO_3$ (منبع نیتروژن) و K_2HPO_4 (منبع فسفر) غلظت یکسانی داشتند، اما غلظت نیترات و فسفات متغیر بود. تمام غلظت‌ها بر اساس پیش آزمایش‌ها و محدودیت‌های کشت انتخاب شدند. برای بررسی اثر غلظت‌های مختلف از طرح کاملا" تصادفی آزمایش فاکتوریل و نرم‌افزار Minitab (ویرایش 21.1.0) استفاده شد. سطوح در نظرگرفته شده برای متغیرها (غلظت نیترات و فسفات) در هر آزمایش در جدول ۱ نشان داده شده است. آزمایشات دو بار تکرار شدند.

جدول ۱- سطوح در نظرگرفته شده برای غلظت نیترات و فسفات در آزمایش‌های انجام شده

Table 1- The considered levels for the nitrate and phosphate concentration in the experiments

آزمایش Run	$NaNO_3$ $(\frac{g}{L})$	K_2HPO_4 $(\frac{g}{L})$
1	0.04	0.01
2	0.04	0.04
3	0.04	0.16
4	0.25	0.01
5	0.25	0.04
6	0.25	0.16
7	1.50	0.01
8	1.50	0.04
9	1.50	0.16

غلظت فیتوهورمون

برای بررسی اثر فیتوهورمون بر رشد و تولید رنگدانه از فیتوهورمون نفتالن استیک اسید استفاده شد. محیط کشت BG11 تهیه شد و سپس به آن نفتالن استیک اسید اضافه شد. به‌طوری‌که غلظت نهایی فیتوهورمون در محیط کشت برابر ۰، ۲/۵، ۵، ۷/۵، ۱۰ و ۱۲ ppm بود.

روش‌های آنالیز

تعیین وزن خشک

در پایان مرحله رشد جهت اندازه‌گیری میزان زیست‌توده، ۱۵۰ میلی‌لیتر محلول ریزجلبک به فالکون‌های ۱۵ میلی‌لیتری منتقل و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۴۴۰۰ rpm سانتریفوژ شد. مایع شفاف رویی جدا شد و زیست‌توده باقی مانده دوبار با آب مقطر شستشو داده شد. سپس زیست‌توده‌ی مرطوب، جهت تعیین وزن خشک به مدت ۲۴ ساعت درون آون با دمای ۴۵ درجه قرار داده شد. پس از خشک شدن زیست توده، وزن آن با ترازو اندازه‌گیری شد.

آنالیز رنگدانه‌ها

برای آنالیز رنگدانه‌های *کلرلا* (کلروفیل a، کلروفیل b و کارتنوئیدها)، از روش جورج و همکاران با اندکی اصلاح استفاده شد (George *et al*., 2014). به میزان ۱ mL نمونه از محیط کشت حاوی ریزجلبک برداشته شد و بعد از ۵ دقیقه سانتریفیوژ با دور ۱۰۰۰۰ rpm، مایع رویی جدا شد و با ۱ mL متانول جایگزین شد. پس از ورتکس شدن، در تاریکی و دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ساعت قرار داده شد. پس از آن، زیست‌توده به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. جذب محلول بالایی نمونه در طول موج‌های ۶۶۵، ۶۵۲ و ۴۷۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (آمریکا، Unico2100 UV-VIS2100) اندازه‌گیری شد. غلظت رنگدانه‌ها توسط معادلات ۱ تا ۳ محاسبه شد (Lichtenthaler, 1987).

$$\text{Chl a (mg/L)} = 16.72 \times A_{665} - 9.16 \times A_{652} \quad (۱)$$

$$\text{Chl b (mg/L)} = 34.09 \times A_{652} - 15.28 \times A_{665} \quad (۲)$$

$$\text{Car (mg/L)} = (1000 \times A_{470} - 1.63 \times \text{Chl a} - 104.9 \times \text{Chl b}) /221 \quad (۳)$$

که در این روابط Chl a کلروفیل a، Chl b کلروفیل b و Car کاروتنوئیدها است.

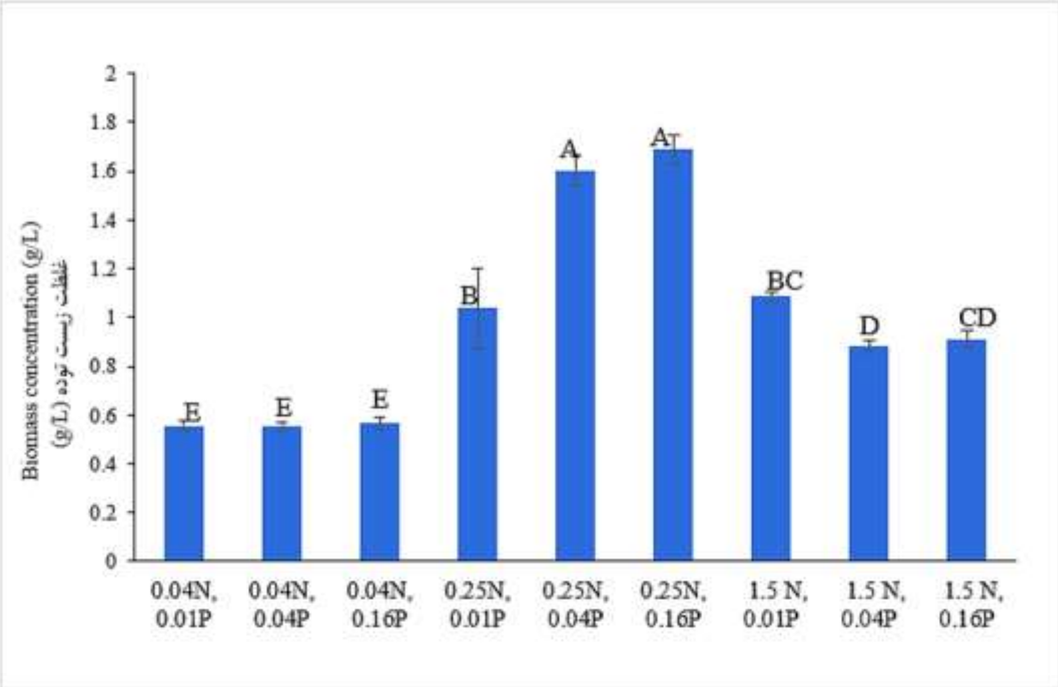
نتایج و بحث

اثر نیترات و فسفات بر رشد

رشد ریزجلبک‌ها به شدت وابسته به غلظت نیترات و فسفات در محیط کشت است. در این پژوهش، میزان تغییرات رشد ریزجلبک با در نظر گرفتن غلظت‌های متفاوتی از نیترات و فسفات بررسی شد. نتایج حاصل از این آزمایشات در شکل ۱ نشان داده شده است. بیش‌ترین مقدار رشد در شرایط $g\,L^{-1}$ ۰/۲۵ نیترات و $g\,L^{-1}$ ۰/۰۴ فسفات بدست آمد که برابر با $g\,L^{-1}$ ۰/۰۶ ± ۱/۶۰ است. با توجه به نتایج بدست آمده هنگامی که غلظت نیترات بسیار کم ($g\,L^{-1}$ ۰/۰۴) است، تغییر غلظت فسفات اثری بر روی میزان رشد ندارد. با افزایش غلظت نیترات تا $g\,L^{-1}$ ۰/۲۵، افزایش فسفات از $g\,L^{-1}$ ۰/۰۱ به $g\,L^{-1}$ ۰/۰۴ باعث افزایش غلظت زیست‌توده از $g\,L^{-1}$ ۰/۱۶ ± ۱/۰۴ به $g\,L^{-1}$ ۰/۰۶ ± ۱/۶۰ شد، اما افزایش بیش‌تر فسفات تا $g\,L^{-1}$ ۰/۱۶ اثر چشمگیری بر روی رشد ندارد. هنگامی که نیترات در بالاترین میزان خود بود ($g\,L^{-1}$ ۱/۵)، افزایش فسفات از $g\,L^{-1}$ ۰/۰۱ تا $g\,L^{-1}$ ۰/۰۴

باعث کاهش رشد شد. بنابراین غلظت مناسب فسفات وابسته به غلظت نیترات است. در پژوهشی که بر روی *Chlorella regularis* انجام شد، مشاهده شد که در شرایط کمبود نیترات، افزودن فسفات به محیط می‌تواند میزان رشد را افزایش دهد (Fu *et al*., 2017).

به‌طور کلی بیش‌ترین میزان رشد مربوط به آزمایشاتی است که میزان نیترات آن‌ها $0/25\ g\,L^{-1}$ است و نیترات بیش‌تر و کم‌تر از این مقدار باعث کاهش رشد شد. این نتیجه وابسته به میزان فسفات نیست و برای تمام غلظت‌های فسفات صادق است. برای مثال، با مقایسه‌ی نتایج آزمایشاتی که میزان فسفات آن‌ها $0/04\ g\,L^{-1}$ است و فقط نیترات آن‌ها متفاوت است (آزمایش‌های ۲، ۵ و ۸)، کاهش نیترات از $1/5\ g\,L^{-1}$به $0/25\ g\,L^{-1}$ باعث افزایش رشد ریزجلبک تا ۸۱/۸ ٪ شد، به‌طوری‌که غلظت زیست‌توده از $0/88 \pm 0/02\ g\,L^{-1}$ به $1/60 \pm 0/06\ g\,L^{-1}$ رسید. اما کاهش بیش‌تر نیترات از $0/25\ g\,L^{-1}$ تا $0/04\ g\,L^{-1}$ باعث کاهش رشد به میزان ۶۵/۶ ٪ شد. برای رسیدن به حداکثر میزان رشد لازم است که غلظت مناسب از هر کدام از مواد مغذی تعیین شوند (Venkatesan *et al*., 2013).



شکل ۱- اثر غلظت‌های متفاوت نیترات و فسفات بر روی غلظت زیست توده *کلرلا*

N نیترات و P فسفات است. اعداد غلظت‌ها را نشان می‌دهند. براساس آزمون توکی، نتایج با حروف یکسان تفاوت معنادار ندارند.

Fig. 1- The effect of different concentrations of nitrate and phosphate on the biomass concentrations of *Chlorella*

N nitrate and P phosphate. The numbers show the concentrations. The results with the same letters are not significantly different.

مطالعات گذشته نیز این نتایج را تأیید می‌کنند. افزودن مقدار جزئی نیترات به محیط کشت *Schizochytrium* sp. باعث افزایش ۴۴ درصدی غلظت زیست‌توده شد. در صورتی‌که افزودن مقدار زیاد نیترات بی‌فایده بود و باعث افزایش بیش‌تر غلظت زیست‌توده نشد (Ju *et al*., 2020). در پژوهش دیگری، میزان رشد *C. vulgaris* با خوراک‌دهی $0/13\ g\,L^{-1}$ نیترات، حدود ۴۶٪ افزایش یافت (Mujtaba *et al*., 2012). افزایش فسفات از $0/022\ g\,L^{-1}$ تا $0/444\ g\,L^{-1}$ باعث افزایش رشد *Botryococcus braunii* شد (Ruangsomboon 2012). افزایش فسفات از ۰ تا ۵۲/۵ μM نیز باعث افزایش غلظت زیست‌توده *Monodus subterraneus* شد، اما افزایش بیش‌تر فسفات تا ۱۷۵ μM دیگر باعث بالارفتن غلظت زیست‌توده نشد (Khozin-Goldberg and Cohen, 2006).

اثر نیترات و فسفات بر غلظت رنگدانه‌ها

نیترات و فسفات از جمله مواد مغذی محیط کشت هستند که تغییر غلظت آن‌ها اثر زیادی بر روی تولید رنگدانه‌ها می‌گذارد. در جدول ۲ غلظت رنگدانه‌ها در غلظت‌های مختلف از نیترات و فسفات نشان داده شده است. بیش‌ترین میزان تولید کلروفیل a و b و کاروتنوئیدها در شرایط $1/5\ g\,L^{-1}$ نیترات و $0/04\ g\,L^{-1}$ فسفات به‌ترتیب برابر $0/80 \pm 24/58$، $0/42 \pm 12/60$ و $0/21 \pm 6/75\ mg\,L^{-1}$ بدست آمد.

هنگامی‌که غلظت نیترات بسیار کم ($g\ L^{-1}$ ۰/۰۴) است، تغییر غلظت فسفات اثر معنا داری بر میزان تولید هیچ‌کدام از رنگدانه‌ها ندارد. با افزایش نیترات تا $g\ L^{-1}$ ۰/۲۵، تغییر غلظت فسفات همچنان اثر معناداری بر روی کلروفیل b و کاروتنوئیدها ندارد و فقط میزان کلروفیل a تحت تأثیر غلظت فسفات قرار دارد، به‌طوری‌که با افزایش غلظت فسفات از $g\ L^{-1}$ ۰/۰۱ تا $g\ L^{-1}$ ۰/۱۶ غلظت کلروفیل a حدود ۳۸/۹ ٪ کاهش می یابد. تغییر غلظت فسفات تنها در مواردی که غلظت نیترات بالا (۱/۵ g/L) است، باعث تغییر در غلظت کل رنگدانه‌ها می شود. در غلظت $g\ L^{-1}$ ۱/۵ از نیترات، افزایش غلظت فسفات از $g\ L^{-1}$ ۰/۰۱ به $g\ L^{-1}$ ۰/۰۴ باعث ۲/۲۳ و ۲/۴۵ برابر شدن غلظت کلروفیل aو b و ۱/۶۵ برابر شدن غلظت کاروتنوئیدها شد. البته افزایش بیش‌تر غلظت فسفات ($g\ L^{-1}$ ۰/۱۶) تأثیری بر میزان رنگدانه‌ها ندارد.

همان‌طور که از نتایج مشخص است، افزایش نیترات از $g\ L^{-1}$ ۰/۰۴ تا $g\ L^{-1}$ ۱/۵ باعث افزایش تولید رنگدانه‌ها شد (بدون توجه به غلظت فسفات). پژوهش‌های گذشته نیز درستی این نتایج را تأیید می‌کنند. در پژوهشی، افزایش نیترات از صفر تا $mg\ L^{-1}$ ۷۲ باعث افزایش کلروفیل a و b و کاروتنوئیدهای *Isochrysis galbana* شد (Zarrinmehr *et al*., 2020). به‌طور مشابه در پژوهش دیگری افزایش نیترات از ۰ تا ۳۰ mM باعث افزایش شدید کلروفیل *Chlorella kessleri* شد (Shrestha *et al*., 2020). برعکس، کاهش نیترات باعث شد تا میزان کلروفیل *Scenedesmus* از ۷/۷۱ به $\mu g\ mL^{-1}$ ۲/۶۹ و میزان کارتنوئیدها از ۱/۳ به $\mu g\ mL^{-1}$ ۰/۶۱ کاهش یابد (Pancha *et al*., 2014). گرسنگی نیترات باعث کاهش کاروتنوئیدها و کلروفیل *Acutodesmus dimorphus* شد (Rani and Maróti, 2021). در پژوهشی که در سال ۲۰۱۹ انجام شد، مشاهده شد که کاهش میزان نیترات و فسفات در محیط کشت *T. lutea*، میزان تولید کلروفیل a،کلروفیل c و فوکوزانتین را به شدت کاهش می‌دهد (Huang *et al*., 2019). افزایش غلظت فسفات باعث بالا رفتن تولید رنگدانه‌های *Tetraselmis* (Dammak *et al*., 2017) و *C. kessleri* (Shrestha *et al*., 2020) شد.

جدول ۲- اثر غلظت نیترات و فسفات بر میزان تولید رنگدانه‌ها

Table 2- The effect of nitrate and phosphate concentration on the production of pigments

Run	$NaNO_3$ ($\frac{g}{L}$)	K_2HPO_4 ($\frac{g}{L}$)	Chlorophyll a (mg/L) کلروفیل a ($\frac{mg}{L}$)	Chlorophyll b (mg/L) کلروفیل b ($\frac{mg}{L}$)	Carotenoids (mg/L) کاروتنوئیدها ($\frac{mg}{L}$)
1	0.04	0.01	2.11±0.01^{F*}	0.73±0.16^{E}	1.34±0.02^{F}
2	0.04	0.04	2.56±0.49^{F}	0.97±0.25^{DE}	1.45±0.08^{F}
3	0.04	0.16	2.05±0.12^{F}	0.85±0.05^{DE}	1.37±0.04^{F}
4	0.25	0.01	9.23±0.32^{CD}	3.17±0.32^{C}	3.87±0.2^{CD}
5	0.25	0.04	7.06±0.45^{DE}	2.60±0.14^{CD}	3.43±0.1^{DE}
6	0.25	0.16	5.64±0.07^{E}	1.93±0.06^{CDE}	3.09±0.13^{E}
7	1.50	0.01	10.99±1.03^{C}	5.13±0.64^{B}	4.05±0.35^{C}
8	1.50	0.04	24.5±0.8^{A}	12.59±0.42^{A}	6.70±0.14^{A}
9	1.50	0.16	21.91±0.89^{B}	12.49±1.09^{A}	5.55±. 035^{B}

* نتایج با حروف یکسان تفاوت معنادار ندارند.

*The results with the same letters are not significantly different.

برخلاف رشد، نه تنها تولید رنگدانه با افزایش بیش از حد نیترات کاهش نیافت، بلکه حداکثر میزان تولید رنگدانه‌ها نیز مربوط به آزمایشاتی بود که میزان نیترات حداکثر بود. البته این مورد که غلظت بهینه نیترات برای رسیدن به حداکثر رشد و رنگدانه با یکدیگر برابر نیست در پژوهش‌های گذشته نیز تأیید شده است (Dammak *et al*., 2017; Montes-González *et al*., 2021). در پژوهشی، حداکثر غلظت زیست‌توده و کاروتنوئیدهای *Isochrysis galbana* به‌ترتیب در غلظت $mg\ L^{-1}$ ۱۴۴ و $mg\ L^{-1}$ ۷۲ از نیترات بدست آمد (Zarrinmehr *et al*., 2020). برخی از محققان به این مورد اشاره کردند که در شرایط ایجاد استرس مانند افزایش شدت نور، دمای بالا، اگر چه رشد ریزجلبک کاهش می‌یابد اما تولید کاروتنوئیدها جهت حفظ ریزجلبک در مقابل شرایط استرسی، افزایش می‌یابد.

آنالیز آماری نتایج

آنالیز آماری نتایج براساس غلظت کاروتنوئیدها انجام شد. مقدار P-value کم‌تر از ۰/۰۵ در جدول ۳ نشان می‌دهد که اثر فاکتورها و مدل برازش شده معنادار بوده و به‌طور اتفاقی یا به دلیل پارازیت‌ها و اختلالات نمی‌باشد. علاوه بر این، مقدار ضریب تعیین R^2= ۹۹/۶۸ نشان می دهد که مدل می‌تواند تقریبا" کل تغییرات را توضیح دهد. به منظور بررسی صحت داده‌ها و آنالیز واریانس، از رسم منحنی‌های مقادیر باقی مانده استفاده شد. باقیمانده‌ها یک ابزار اضافی به‌منظور بررسی صحت نتایج هستند. شکل ۲-A نمودار احتمال نرمال باقیمانده‌ها برای غلظت کاروتنوئیدها را نشان می‌دهد. در این نمودار نقاط باقیمانده به

طور مطلوبی در مجاورت خط مستقیم قرار گرفته‌اند. این مجاورت ثابت می‌کند که خطاها به‌طور نرمال توزیع شده‌اند. همچنین خطاها دارای میانگین تقریباً برابر با صفر و ثابت هستند. شکل ۲-B منحنی باقیمانده‌ها بر حسب ترتیب آزمایشات را نشان می‌دهد. همانطور که ملاحظه می‌شود در این شکل الگوی خاصی مشاهده نمی‌شود، یعنی آزمایشات تماماً به‌طور تصادفی انجام شده‌اند که این خود دلیلی بر مستقل بودن خطاها است. در نتیجه دو پارامتر غلظت نیترات و غلظت فسفات نقش مهمی در میزان تولید رنگدانه‌ها (کاروتنوئیدها) داشتند.

اثر فیتوهورمون بر رشد و غلظت کاروتنوئید

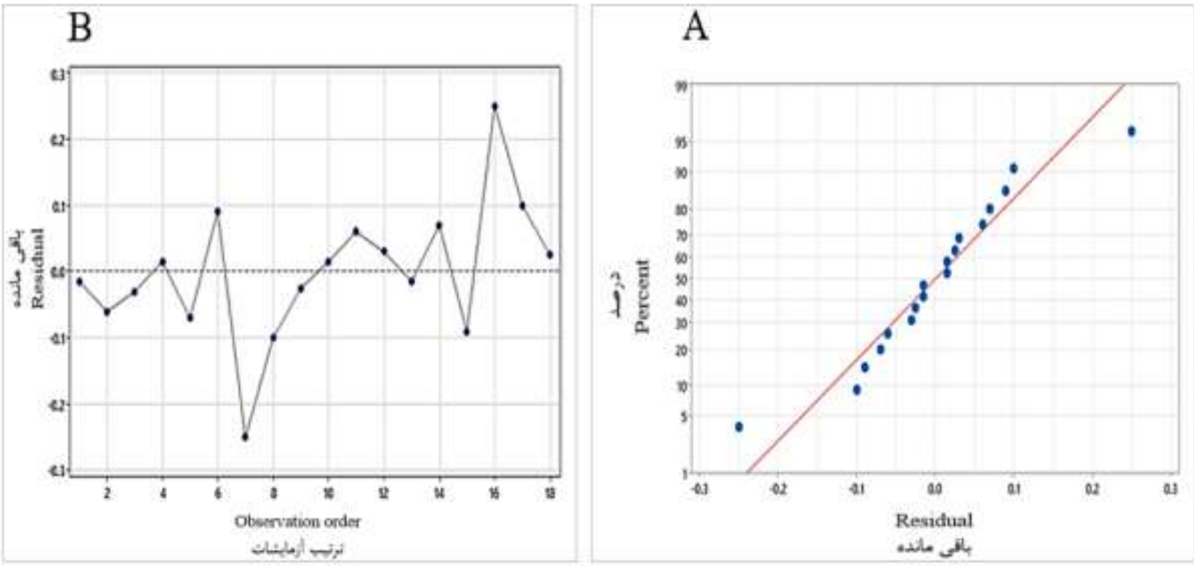
بر حسب نتایج آزمایش‌ها، بیش‌ترین مقدار رشد در شرایط ۰/۲۵ $g\ L^{-1}$ نیترات و ۰/۰۴ $g\ L^{-1}$ فسفات بدست آمد. اما بیش‌ترین غلظت رنگدانه‌ها مربوط به شرایط ۱/۵ $g\ L^{-1}$ نیترات و ۰/۰۴ $g\ L^{-1}$ فسفات بود. با توجه به این‌که هدف افزایش غلظت رنگدانه بود، پس به محیط کشت حاوی ۱/۵ $g\ L^{-1}$ نیترات و ۰/۰۴ $g\ L^{-1}$ فسفات، غلظت های مختلف از فیتوهورمون افزوده شد و رشد و غلظت رنگدانه بررسی شد. نتایج نشان داد که فیتوهورمون اثر چشمگیری بر رشد ندارد (نتایج نشان داده نشد). اما همان‌طور که در شکل ۳ دیده می‌شود، افزودن ۲/۵ ppm نفتالن استیک اسید به محیط کشت باعث افزایش ۲۰/۵ ٪ در میزان کلروفیل a شد. غلظت کاروتنوئیدها با افزایش ۲۶/۷۱ درصدی از ۶/۷۵ ± ۰/۲۱ $mg\ L^{-1}$ به ۸/۴۹ ± ۰/۱۵ $mg\ L^{-1}$ رسید. افزودن فیتوهورمون اثر چشمگیری بر غلظت میزان کلروفیل b نداشت. به‌طور کلی غلظت‌های بسیار بالای نفتالن استیک اسید غلظت رنگدانه‌ها را افزایش نداد.

جدول ۳- آنالیز آماری نتایج بر اساس غلظت کاروتنوئیدها

براساس نتایج بدست آمده از نرم افزار **Minitab**، مقدار **R^2-sq** برابر ۹۹/۶۸ ٪ بود.

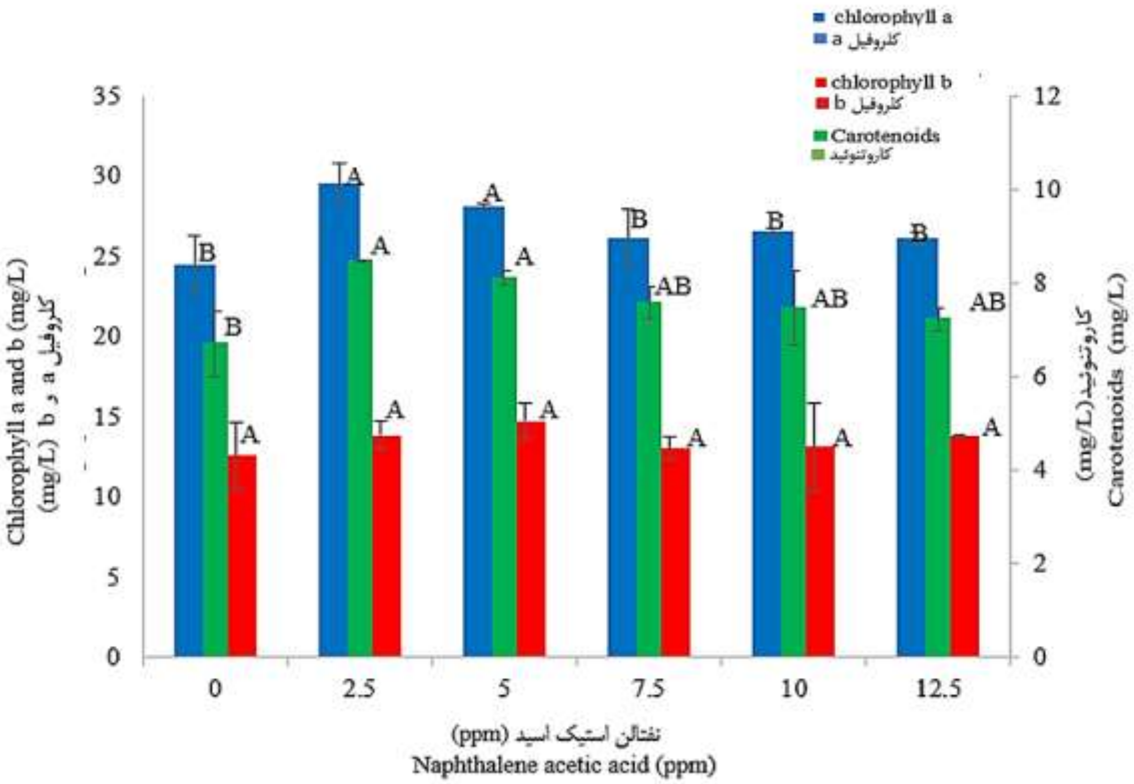
Table 3- Statistical analysis of the results based on the concentration of carotenoids
Based on the results obtained from Minitab software, the value of R2-sq was equal to 99.68%.

Source منبع	DF درجه آزادی	Adj SS مجموع مجذورات	Adj MS میانگین مجذورات	F-Value مقدار-F	P-Value مقدار-P
Model مدل	8	56.8355	7.1044	351.03	0.000
Linear خطی	4	50.9913	12.7478	629.87	0.000
Nitrate نیترات	2	49.1379	24.5690	1213.95	0.000
Phosphate فسفات	2	1.8534	0.9267	45.79	0.000
2-Way Interactions برهم کنش اثر نیترات و فسفات	4	5.8442	1.4611	72.19	0.000
Error خطا	9	0.1822	0.0202		
Total کل	17	57.0177			



شکل ۲- آنالیز باقی مانده‌ها. A) نمودار احتمال نرمال بر حسب باقیمانده‌ها. B) منحنی باقیمانده‌ها بر حسب ترتیب آزمایشات

Fig. 2- Analysis of residuals. A) Normal probability diagram according to residuals. B) The curve of the residuals according to the order of the test



شکل ۳- اثر نفتالن استیک اسید بر غلظت رنگدانه‌ها

براساس آزمون توکی، نتایج با حروف یکسان تفاوت معنادار ندارند.

Fig. 3- The effect of naphthalene acetic acid on the concentration of pigments

The results with the same letters are not significantly different.

در پژوهش‌های گذشته نیز مشاهده شد که mM ۰/۱ ایندول استیک اسید و mM ۱ نفتالن استیک اسید میزان کاروتنوئیدهای *Chlorella vulgaris* را به‌ترتیب ۱۰/۷۷ ٪ و ۴۱/۵۳ ٪ افزایش دادند (Piotrowska-Niczyporuk and Bajguz, 2014). همچنین کلروفیل *C. sorokiniana* در حضور ایندول استیک اسید، کینتین و جیبرلیک اسید افزایش یافت (Guldhe *et al*., 2019). در پژوهشی که در سال ۲۰۲۰ انجام شد، مشاهده شد که جهت سنتز لوتئین در دو ریزجلبک *Kirchneriella aperta* و *Brachiomonas submarina*، افزودن متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید مؤثرتر از افزایش غلظت نیترات و فسفات بودند (Mc Gee *et al*., 2020).

نتیجه‌گیری

نیترات و فسفات از جمله مواد مغذی محیط کشت ریزجلبک‌ها هستند. افزایش این دو ماده مخصوصا" نیترات، باعث افزایش غلظت کاروتنوئیدهای ریزجلبک می‌شود. افزودن فیتوهورمون‌ها به محیط کشت سبب تحریک تولید رنگدانه ها از جمله کاروتنوئیدها می‌شود. لذا فیتوهورمون‌ها ترکیبات مناسبی برای افزایش تولید کاروتنوئیدها در ریزجلبک هستند.

منابع

1. Dammak, M., Hadrich, B., Miladi, R., Barkallah, M., Hentati, F., Hachicha, R., Laroche, C., Michaud, P., Fendri, I. & Abdelkafi, S. (2017). Effects of nutritional conditions on growth and biochemical composition of *Tetraselmis* sp. *Lipids in Health and Disease*, *16*(1), 1-13. https://doi.org//10.1186/s12944-016-0378-1
2. Dao, G.-H., Wu, G.-X., Wang, X.-X., Zhuang, L.-L., Zhang, T.-Y. & Hu, H.-Y. (2018). Enhanced growth and fatty acid accumulation of microalgae *Scenedesmus* sp. LX1 by two types of auxin. *Bioresource Technology*, *247*, 561-567. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.079
3. Fu, L., Cui, X., Li, Y., Xu, L., Zhang, C., Xiong, R., Zhou D. & Crittenden, J.C. (2017). Excessive phosphorus enhances *Chlorella regularis* lipid production under nitrogen starvation stress during glucose heterotrophic cultivation.*Chemical Engineering Journal*, *330*, 566-572. https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.07.182
4. George, B., Pancha, I., Desai, C., Chokshi, K., Paliwal, C., Ghosh, T. & Mishra, S. (2014). Effects of different media composition, light intensity and photoperiod on morphology and physiology of freshwater microalgae *Ankistrodesmus falcatus*–A potential strain for bio-fuel production. *Bioresource Technology*, *171*, 367-374. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.086
5. Guldhe, A., Renuka, N., Singh P., & Bux, F. (2019). Effect of phytohormones from different classes on gene expression of *Chlorella sorokiniana* under nitrogen limitation for enhanced biomass and lipid production. *Algal Research*, *40*, 101518. https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101518
6. Huang, B., Marchand, J., Thiriet-Rupert, S., Carrier, G., Saint-Jean, B., Lukomska, E., Moreau, B., Morant-Manceau, A., Bougaran, G., & Mimouni, V. (2019). Betaine lipid and neutral lipid production under nitrogen or phosphorus limitation in the marine microalga *Tisochrysis lutea* (Haptophyta). *Algal Research*, *40*, 101-506. https://doi.org/10.1016 /j.algal.2019.101506
7. Ju, J.-H., Ko, D.-J., Heo, S.-Y., Lee, J.-J., Kim, Y.-M., Lee, B.-S., Kim, M.-S., Kim, C.-H., Seo, J.-W., & Oh, B.-R. (2020). Regulation of lipid accumulation using nitrogen for microalgae lipid production in *Schizochytrium* sp. ABC101. *Renewable Energy*, *153*, 580-587. https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.02.047
8. Khozin-Goldberg, I., & Cohen, Z. (2006). The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*. *Phytochemistry*, *67*(7), 696-701. https://doi.org/10.1016/j. phytochem.2006.01.010
9. Lichtenthaler, H.K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. pp 350-382. *Methods in enzymology*, Elsevier. https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1
10. Liu, J., Yuan, C., Hu G., & Li, F. (2012). Effects of light intensity on the growth and lipid accumulation of microalga *Scenedesmus* sp. 11-1 under nitrogen limitation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *166*(8), 2127-2137. https://doi.org/ 10.1007/s12010-012-9639-2
11. Lv, H., Wang, Q.-e., Wang, S., Qi, B., He, J., & Jia, S. (2019). Enhancing biomass production of *Dunaliella salina* via optimized combinational application of phytohormones. *Aquaculture*, *503*, 146-155.
12. Maswanna, T., & Maneeruttanarungroj, C. (2022). Identification of major carotenoids from green alga *Tetraspora* sp. CU2551: partial purification and characterization of lutein, canthaxanthin, neochrome, and β-carotene. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *38*(8), 1-13. https://doi.org/10.1007/s11274-022-03320-6

13. Mc Gee, D., Archer, L., Fleming, G.T., Gillespie, E., & Touzet, N. (2020). The effect of nutrient and phytohormone supplementation on the growth, pigment yields and biochemical composition of newly isolated microalgae. *Process Biochemistry*, *92*, 61-68. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.03.001
14. Montes-González, O., González-Silvera, A., Valenzuela-Espinoza, E., Santamaría-del-Ángel, E., & López-Calderón, J. (2021). Effect of light intensity and nutrient concentration on growth and pigments of the green microalga *Tetraselmis suecica*. *Latin American Journal of Aquatic Research*, *49*(3), 431-441.
15. Mujtaba, G., Choi, W., Lee, C.-G., & Lee, K. (2012). Lipid production by *Chlorella vulgaris* after a shift from nutrient-rich to nitrogen starvation conditions. *Bioresource Technology*, *123*, 279-283. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012. 07.057
16. Nwoba, E.G., Ogbonna, C.N., Ishika, T., & Vadiveloo, A. (2020). Microalgal pigments: a source of natural food colors. *Microalgae Biotechnology for Food, Health and High Value Products*, 81-123. https://doi.org/10.1007/978-981-15-0169-2_3
17. Pal, D., Khozin-Goldberg, I., Cohen, Z., & Boussiba, S. (2011). The effect of light, salinity, and nitrogen availability on lipid production by *Nannochloropsis* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *90*(4), 1429-1441. https://doi.org/ 10.1007/s00253-011-3170-1
18. Pancha, I., Chokshi, K., George, B., Ghosh, T., Paliwal, C., Maurya, R., & Mishra, S. (2014). Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. *Bioresource Technology*, *156*, 146-154. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.025
19. Paniagua-Michel, J. (2015). Microalgal nutraceuticals. pp 255-267. *Handbook of marine microalgae*, Elsevier. México. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800776-1.000169
20. Park, W.-K., Yoo, G., Moon, M., Kim, C.W., Choi, Y.-E., & Yang, J.-W. (2013). Phytohormone supplementation significantly increases growth of *Chlamydomonas reinhardtii* cultivated for biodiesel production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *171*(5), 1128-1142. https://doi.org/10.1007/s 12010-013-0386-9
21. Piotrowska-Niczyporuk, A., & Bajguz, A. (2014). The effect of natural and synthetic auxins on the growth, metabolite content and antioxidant response of green alga *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae). *Plant Growth Regulation*, *73*(1), 57-66. https://doi.org/10.1007/s10725-013-9867-7
22. Piotrowska-Niczyporuk, A., Bajguz, A., Zambrzycka-Szelewa, E., & Bralska, M. (2018). Exogenously applied auxins and cytokinins ameliorate lead toxicity by inducing antioxidant defence system in green alga *Acutodesmus obliquus*. *Plant Physiology and Biochemistry*, *132*, 535-546. https://doi.org/10.1016/j.plaphy. 2018.09.038
23. Rani, V., & Maróti, G. (2021). Assessment of nitrate removal capacity of two selected eukaryotic green microalgae. *Cells*, *10*(9), 2490. https://doi. org/10.3390/cells10092490
24. Ruangsomboon, S. (2012). Effect of light, nutrient, cultivation time and salinity on lipid production of newly isolated strain of the green microalga, *Botryococcus braunii* KMITL 2. *Bioresource Technology*, *109*, 261-265. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.07.025
25. Sathasivam, R., & Ki, J.-S. (2018). A review of the biological activities of microalgal carotenoids and their potential use in healthcare and cosmetic industries. *Marine Drugs*, *16*(1), 26. https://doi.org/10.3390/md16010026
26. Shrestha, N., Dandinpet, K.K., & Schneegurt, M.A. (2020). Effects of nitrogen and phosphorus limitation on lipid accumulation by *Chlorella kessleri* str. UTEX 263 grown in darkness. *Journal of Applied Phycology*, *32*(5), 2795-2805. https://doi.org/10.1007/s10811-020-02144-x
27. Shu, C.H., Tsai, C.C., Liao, W.H., Chen, K.Y., & Huang, H.C. (2012). Effects of light quality on the accumulation of oil in a mixed culture of Chlorella sp. and Saccharomyces cerevisiae. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, *87*(5), 601-607. https://doi.org/10.1002/jctb.2750
28. Simionato, D., Basso, S., Giacometti, G.M., & Morosinotto, T. (2013). Optimization of light use efficiency for biofuel production in algae. *Biophysical Chemistry*, *182*, 71-78. https://doi.org/10.1016/j.bpc.2013.06.017
29. Sirisuk, P., Ra, C.-H., Jeong, G.-T., & Kim, S.-K. (2018). Effects of wavelength mixing ratio and photoperiod on microalgal biomass and lipid production in a two-phase culture system using LED illumination. *Bioresource Technology*, *253*, 175-181. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.020
30. Udayan, A., Pandey, A.K., Sirohi, R., Sreekumar, N., Sang, B.-I., Sim, S.J., Kim, S.H., & Pandey, A. (2022). Production of microalgae with high lipid content and their potential as sources of nutraceuticals. *Phytochemistry Reviews*, 1-28. https://doi.org/10.1007/s11101-021-09784-y
31. Venkatesan, S., Swamy, M.S., Jayavel, D., Senthil, C., & Bhaskar, S. (2013). Effects of nitrate and phosphate on total lipid content and pigment production in *Botryococcus braunii* Kutzing KM-104. *Journal of Applied Phycology*, *23*(6): 1031-1037. https://doi.org/10.1007/s10811-010-9636-1
32. Zarrinmehr, M.J., Farhadian, O., Heyrati, F.P., Keramat, J., Koutra, E., Kornaros, M., & Daneshvar, E. (2020). Effect of nitrogen concentration on the growth rate and biochemical composition of the microalga, *Isochrysis galbana*. *Journal of Aquatic Research*, *46*(2), 153-158. https://doi.org/10.1016/j.ejar.2019.11.003